·论著·

灌胃牙龈卟啉单胞菌对 2 型糖尿病小鼠结肠机械屏障及免疫屏障影响的研究

李萧纹[1]，闫福华[2]，陈文文[1]，黄明坤[1]，莫朝伦[3]，张军梅[1]

1.550001 贵州省贵阳市，贵州医科大学口腔医学院
2.210008 江苏省南京市，南京大学
3.550001 贵州省贵阳市，贵州医科大学附属口腔医院
*通信作者：张军梅，主任医师 / 教授；E-mail：zjm46688@126.com

【摘要】 **背景** 牙龈卟啉单胞菌（Pg.）是牙周炎的主要致病菌，研究发现 Pg. 能够通过口腔 – 肠道途径对 2 型糖尿病（T2DM）在内的全身疾病产生影响，而其具体机制尚不完全明确。**目的** 探究 Pg. 是否通过改变肠道机械屏障及免疫屏障对 T2DM 产生影响。**方法** 40 只 SPF 级小鼠，随机挑选 24 只构建 T2DM 模型，建模成功小鼠中挑选 16 只分为模型组（DM 组，n=8）和模型 + 牙龈卟啉单胞菌组（PD 组，n=8），其余 16 只小鼠分为对照组（N 组，n=8）和 Pg. 组（n=8）。建模后观察小鼠体质量和空腹血糖（FPG），第 5 周进行进行口服葡萄糖耐量试验（OGTT），绘制 OGTT 曲线并计算曲线下面积（AUC）。第 7 周起 Pg. 组和 PD 组灌饲 Pg. 菌液，连续灌饲 5 周。酶联免疫吸附测定脂多糖（LPS），实时荧光定量 PCR 检测结肠紧密连接蛋白及炎症因子，苏木素 – 伊红（HE）染色观察小鼠结肠组织病变。采用 Pearson 相关性或 Spearman 相关性分析探究小鼠 FPG 与结肠紧密连接蛋白 mRNA 表达及血清 LPS 含量的关系。**结果** 灌胃前第 2~6 周 DM 组体质量高于 N 组、Pg. 组，PD 组体质量高于 N 组，第 3~6 周 PD 组体质量高于 Pg. 组。第 9~11 周 N 组、Pg. 组体质量高于 DM 组、PD 组，第 11 周 PD 组体质量低于 DM 组。第 3~6 周 PD 组 FPG 高于 N 组、Pg. 组，第 4~6 周 DM 组高于 N 组、Pg. 组。第 7~11 周 Pg. 组 FPG 低于 DM 组、PD 组，PD 组高于 N 组，第 10、11 周 PD 组高于 Pg. 组。DM 组 AUC 高于 N 组、Pg. 组，PD 组高于 N 组、DM 组、Pg. 组，PD 组 LPS 高于 N 组、DM 组。PD 组紧密连接蛋白 1（ZO-1）低于 N 组，DM 组闭合蛋白（Occludin）低于 N 组，PD 组 Occludin 低于 N 组、DM 组、Pg. 组，PD 组白介素（IL）17A 低于 N 组、Pg. 组，N 组 IL-10 高于 DM 组、Pg. 组、PD 组，PD 组肿瘤坏死因子（TNF-α）高于 N 组、DM 组、Pg. 组，Pg. 组、PD 组 Toll 样受体 4（TLR4）高于 N 组。相关性分析结果表明，FPG 与 LPS 呈正相关，与 Occludin 呈负相关（P<0.05）。病理结果示 Pg. 组和 DM 组固有层可见结缔组织增生，伴淋巴细胞灶性浸润，PD 组固有层伴淋巴细胞灶性浸润。**结论** Pg. 可能通过破坏肠道机械屏障及免疫屏障导致 LPS 入血，加重 T2DM 小鼠糖代谢紊乱。

【关键词】 糖尿病，2 型；葡萄糖代谢障碍；牙龈卟啉单胞菌；肠道紧密连接蛋白；肠道免疫

【中图分类号】 R 587.1 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0386

Effects of Irrigation of Porphyromonas Gingivalis on Colonic Mechanical and Immune Barriers in Type 2 Diabetic Mice

LI Xiaowen[1]，YAN Fuhua[2]，CHEN Wenwen[1]，HUANG Mingkun[1]，MO Chaolun[3] ZHANG Junmei[1]

1.College of Stomatolgy of Guizhou Medical University，Guiyang 550001，China
2.Nanjing University，Nanjing 210008，China
3.Stomatology Hospital of Guizhou Medical University，Guiyang 550001，China
Corresponding author：ZHANG Junmei，Chief physician/Professor；E-mail：zjm46688@126.com

【Abstract】 Background Porphyromonas gingivalis（Pg.）is the main pathogen of periodontitis. Studies have found

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81970939）；贵州省卫生健康委项目（gzwkj2023-61）

引用本文：李萧纹，闫福华，陈文文，等 . 灌胃牙龈卟啉单胞菌对 2 型糖尿病小鼠结肠机械屏障及免疫屏障影响的研究［J］. 中国全科医学，2023.［Epub ahead of print］. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0386.［www.chinagp.net］

LI X W，YAN F H，CHEN W W，et al. Effects of irrigation of porphyromonas gingivalis on colonic mechanical and immune barriers in type 2 diabetic mice［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

本文数字出版日期：

that Pg. can affect systemic diseases including type 2 diabetes mellitus （T2DM）through oral-intestinal pathway，but its specific mechanism remains unclear. Objective To explore whether Pg. has an effect on T2DM by changing intestinal mechanical and immune barriers. Methods A total of 24 among 40 SPF mice were randomly selected to construct T2DM models， among the successful models，16 mice were selected to be divided into the model group（DM group，n=8）and model+Porphyromonas gingivalis group（PD group，n=8），and the other 16 mice were divided into the control group（N group，n=8）and Pg. Group（n=8）. After modeling，body mass and fasting blood glucose（FPG）of mice were observed，and oral glucose tolerance test（OGTT）was performed at the 5th week，OGTT curve was plotted and the area under the curve（AUC）was calculated. Pg. group and PD group were gavaged with Pg. bacterial solution from the 7th week for 5 consecutive weeks. Lipopolysaccharide（LPS）was determined by enzyme-related immunosorbent assay（ELISA），colonic tight-junction protein and inflammatory factors were detected by real-time fluorescence quantitative PCR，and colonic tissue lesions were observed by hematoxylin-eosin（HE）staining. Pearson correlation or Spearman correlation analysis was used to investigate the relationship of FPG with colonic tight junction protein mRNA expression and serum LPS levels in mice. Results Body weight of DM group was higher than that of N group and Pg. group at 2nd to 6th weeks before irrigation，and body weight of PD group was higher than that of N group and body weight of PD group was higher than that of Pg. group at 3rd to 6th weeks before irrigation. The body weight of N group and Pg group was higher than that of DM group and PD group at 9th to 11th weeks，and the body weight of PD group was lower than that of DM group at 11th week. FPG in PD group was higher than that in the N and Pg. groups at 3rd to 6th weeks，and FPG in the DM group at 4th to 6th weeks was higher than that in N and Pg. groups. FPG of Pg. group was lower than that of the DM group and PD group at 7th to 11th weeks，PD group was higher than that of the N group，and PD group at week 10 and 11 was higher than the Pg. group. AUC in the DM group was higher than that in the N group and Pg. group，and PD group was higher than that in the N group，DM group and Pg. group. LPS of PD group was higher than that of N group and DM group. Tight junction protein 1（ZO-1）in the PD group was lower than that in the N group，Occludin in the DM group was lower than that in the N group，Occludin in the PD group was lower than that in the N group，DM group and Pg. group. The interleukin（IL）17A in the PD group was lower than that in the N group and Pg. group，and IL-10 in the N group was higher than that in the DM group and Pg. group. Tumor necrosis factor（TNF-α）in the PD group was higher than that in the N group，DM group and Pg. group. Toll-like receptor 4（TLR4）in the Pg. group and PD group was higher than that in N group. Correlation analysis showed that FPG was positively correlated with LPS，and negatively correlated with Occludin（P<0.05）. The pathological results showed connective tissue hyperplasia with focal lymphocyte infiltration in the lamina propria in the Pg. and DM groups，and the lamina propria with focal lymphocyte infiltration in the PD group. Conclusion Pg. may aggravate the glucose metabolism disorders of T2DM mice by disrupting the intestinal mechanical barrier and immune barrier leading to LPS entry into the bloodstream.

【Key words】 Diabetes Mellitus，type 2；Glucose metabolism disorders；Porphyromonas gingivalis；Intestinal tight junction protein；Intestinal immune

牙周炎（PD）是由菌斑微生物感染引起牙周组织的的慢性炎症性疾病，是导致成人牙列缺损、缺失的重要原因，还与多种代谢性、炎症性和自身免疫性疾病如2型糖尿病（T2DM）、高脂血症、动脉粥样硬化性血管疾病和类风湿关节炎等密切相关[1]。T2DM是发病率增长最快的代谢性疾病[2]，其主要特征是胰岛素分泌相对不足和胰岛素抵抗，其致死率仅次于心血管疾病和肿瘤。研究发现，牙周炎与T2DM存在相互促进的关系，T2DM是牙周炎的重要危险因素，同时牙周炎也可能影响T2DM的发生发展[3-4]。

近年来，多项研究证实，牙周炎特异性菌群能通过肠道菌群及肠道屏障对全身多器官疾病产生影响，呈现“口–肠–多器官”模式，如结肠炎、关节炎、脑病、糖尿病、高脂血症等[5-7]。牙龈卟啉单胞菌（Pg.）是牙周炎的主要致病菌，研究发现，其能够随吞咽进入肠道，引起肠道微生物区系组成发生改变，导致肝脏、脾脏、肠道等器官出现炎症反应[8]。结肠黏膜的厌氧和高PH环境更有利于Pg.的黏附[9]，一旦发生菌群失调，有害细菌占据主导地位，会引起宿主肠道免疫状态以及肠道屏障功能受损，细菌毒素和代谢物等毒性物质可能通过肠道进入体循环中，导致身体远处各组织和器官受损[10]，进而增加了以低度炎症为特征的其他系统性疾病的发病风险，而Pg.引起肠道屏障破坏及免疫失衡的具体机制尚不完全明确。

本研究建立T2DM小鼠模型，通过灌胃的方式，模拟牙周炎患者唾液内Pg.随吞咽动作进入肠道，观察肠道炎症及紧密连接蛋白变化，以及其与血糖变化之间的关系，探索Pg.是否通过改变肠道免疫屏障和机械屏障功能影响糖代谢。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验材料

1.1.1 2022 年 5 月 —2023 年 2 月，40 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠，SPF 级，体质量 20~22 g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司（动物许可证号：110322220102485742）。实验小鼠适应性喂养 1 周后进行实验，期间 12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环，温度（24±1）℃，湿度（60±10）%，小鼠自由摄食、饮水。动物实验于贵州医科大学实验动物中心完成，通过贵州医科大学实验动物伦理委员会批准（审批号：2201457）。

1.1.2 主要试剂：链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）（索莱宝科技有限公司，货号：S8050）；牙龈卟啉单胞菌株（ATCC33277）（北纳生物，货号：BNCC236547）；小鼠脂多糖（LPS）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（华美生物，货号：CSB-E09308H）；脑心浸液琼脂（BHI）固体培养基（索莱宝科技有限公司，LA0360）；Trizol（Takara，货号：9108）；cDNA 反转录试剂盒（Prime Script™ RT masters Mix，Takara，货号：RR036A）；TB Green Premix Ex Taq（Takara，货号：RR820A）；HE 染色试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，货号：G1003）。主要仪器：罗氏卓越精采型血糖仪；实时荧光定量 PCR 仪（Bio-RAD）；Infinite F50 经济型光吸收酶标仪（TECAN）；无菌厌氧箱（AW500TG）（ELECTROTEK）；低温高速离心机（Thermo Fisher）；高速低温组织研磨机（武汉塞维尔生物科技有限公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组与建模：适应性喂养 1 周后，随机数字表法随机选取 24 只小鼠用于 T2DM 建模，采用高脂饮食（标准 60% 脂肪供能纯化型饲料）连续饲养 4 周，期间自由摄食、饮水。其余 16 只小鼠随机分为对照组（N 组，n=8）和 Pg. 组（n=8），同期给予对照饲料（35% 脂肪供能饲料）喂养。建模小鼠腹腔注射 30 mg/kg 的 2%STZ，1 周内连续腹腔注射 3 次，N 组腹腔注射相同体积的 0.1 mmol/L（pH=4.5）的柠檬酸缓冲液，以 2 次空腹血糖（FPG）≥ 11.1 mmol/L 或随机血糖≥ 16.7 mmol/L 为 T2DM 成模标准，保留成功模型（21 只），随机选取 16 只分为模型组（DM 组，n=8）和模型 + 牙龈卟啉单胞菌组（PD 组，n=8），建模成功后更换为 35% 脂肪供能饲料继续饲养。

1.2.2 牙龈卟啉单胞菌株用 BHI 固体培养板 37 ℃厌氧环境（80%N2、10%H2、10%CO2）培养 7 d。转移至 BHI 液体培养基增菌 16~18 h，于细菌生长对数期时，以 3 500 r/min 离心 5 min（离心半径 8.6 cm），弃上清。用无菌磷酸缓冲盐溶液（PBS）重悬细菌沉淀后，测量细菌悬液吸光度，调整浓度为 1×109 CFU/mL。于第 7 周起 Pg. 组和 PD 组灌饲 200 μL 含 1×109 CFU/mL Pg. 的菌液，2 次 / 周，DM 组和 N 组灌饲等量无菌 PBS，连续灌饲 5 周。

1.2.3 建模后和灌胃后每日（或者隔 1 日）观察小鼠的精神状态、活动情况、毛发色泽变化、垫料干湿情况等一般状态。检测小鼠体质量变化及 FPG，1 次 / 周。在 5 周末进行口服葡萄糖耐量试验（OGTT）：隔夜禁食 12 h，对小鼠按 2 g /kg 剂量灌胃 25% 葡萄糖注射液，在 0、30、60、90、120 min 时间点尾静脉采血，使用血糖计测定血糖值。绘制 OGTT 曲线，计算曲线下面积（AUC）。

1.2.4 灌胃 5 周后，1.25% 阿佛丁（0.2 mL/10 g）腹腔注射麻醉小鼠后心脏取血收集血液，后用 5% 水合氯醛（0.2 mL/10g）腹腔注射麻醉处死，收集结肠组织（近盲肠段），取部分置于 4% 多聚甲醛固定，部分加入 RNA 稳定液置于 -80 ℃冰箱用于后续检测。

1.2.5 心脏取血收集于 1.5 mL 离心管中，4° C 过夜后于 2~8° C，1 000×g 离心 15 min，取上清，按照小鼠 LPS ELISA 试剂盒说明书步骤加样，全自动酶标仪测定 450 nm 处的吸光度（OD 值），绘制标准曲线计算得相应浓度。

1.2.6 实时荧光定量 PCR（qPCR）检测结肠紧密连接蛋白及炎症因子：称取 0.1 g 结肠组织，低温高速组织研磨机进行研磨，Trizol 法提取 RNA，超微量核酸分析仪测量总 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒，将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。以甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参基因，使用 TB GreenTM Premix Ex TaqTM Ⅱ进行 qPCR 检测，每样本设置 3 个复孔并计算 mRNA 的相对表达，引物由生工生物工程股份有限公司提供。引物序列见表 1。

1.2.7 取固定好的结肠样本进行梯度乙醇脱水，常规石蜡包埋切片，苏木素 - 伊红（HE）染色，于光学显微镜下观察小鼠结肠组织病变。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析，采用 Graghpad Prism 9.0 软件绘图。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间均数比较采用重复测量方差分析或单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验或 Bonferroni 法；不符合正态分布的计量资料以 M（P_{25}，P_{75}）表示，组间两两比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。采用 Pearson 相关性或 Spearman 相关性分析探究小鼠 FPG 与结肠紧密连接蛋白 mRNA 表达及血清 LPS 含量的关系。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组小鼠一般状态及体质量比较

N 组和 Pg. 组小鼠充满活力，毛发柔软有光泽，垫

料干燥，DM 组和 PD 组精神低落，运动较少，垫料潮湿，毛发暗淡，有刺激性气味，饮食及饮水量增加。灌胃前第 2~6 周小鼠体质量比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），灌胃前第 2~6 周 DM 组体质量高于 N 组、Pg. 组，PD 组体质量高于 N 组，第 3~6 周 PD 组体质量高于 Pg. 组。第 1 周 4 组小鼠体质量比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。灌胃后重复测量方差分析结果表明，组别与时间对小鼠体质量存在交互作用（$P_{交互}<0.01$），组别与时间对小鼠体质量主效应均显著（$P_{组间}<0.01$，$P_{时间}<0.01$）。第 9~11 周 N 组、Pg. 组体质量高于 DM 组、PD 组，第 11 周 PD 组体质量低于 DM 组，见表 3。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 qPCR primer sequence

基因	引物
ZO-1	F：5′-GCCGCTAAGAGCACAGCAA-3′
	R：5′-TCCCCACTCTGAAAATGAGGA-3′
Occludin	F：5′-TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA-3′
	R：5′-CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG-3′
IL-17A	F：5'-GAAGGCCCTCAGACTACCTCAA-3′
	R：5′-TCATGTGGTGGTCCAGCTTTC-3′
IL-10	F：5′-TGCTATGCTGCCTGCTCTTA-3′
	R：5′-TCATTTCCGATAAGGCTTGG-3′
TNF-α	F：5′-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3′
	R：5′-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3′
TLR4	F：5′-AGAAATTCCTGCAGTGGGTCA-3′
	R：5′- TCTCTACAGGTGTTGCACATGTCA-3′
GAPDH	F：5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′
	R：5′-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3′

注：ZO-1= 紧密连接蛋白 1，Occludin= 闭合蛋白，IL-17A= 白介素 17A，IL-10= 白介素 10，TNF-α = 肿瘤坏死因子 α，TLR4=Toll 样受体 4，GAPDH= 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶。

2.2 4 组小鼠血糖情况

灌胃前第 3~6 周 4 组小鼠 FPG 比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中第 3~6 周 PD 组高于 N 组、Pg. 组，第 4~6 周 DM 组高于 N 组、Pg. 组，第 1~2 周 4 组小鼠 FPG 比较，差异无统计学意义（$P<0.05$），见表 4。灌胃后重复测量方差分析结果表明，组别与时间对小鼠 FPG 存在交互作用（$P_{交互}=0.021$），组别与时间对小鼠 FPG 主效应均显著（$P_{组间}<0.01$，$P_{时间}<0.01$）。第 7~11 周 Pg. 组 FPG 低于 DM 组、PD 组，PD 组高于 N 组，第 10、11 周 PD 组高于 Pg. 组，见表 5。

组别与时间对小鼠 OGTT 试验各时间点血糖存在交互作用（$P_{交互}=0.013$），组别与时间对小鼠血糖主效应均显著（$P_{组间}<0.01$，$P_{时间}<0.01$）。0~120 min DM 组高于 N 组、Pg. 组，PD 组高于 N 组、DM 组、Pg. 组，120 min Pg. 组高于 N 组，见表 6。4 组小鼠 OGTT AUC 及血清 LPS 含量比较，差异有统计学意义（$P<0.01$），其中 DM 组 AUC 高于 N 组、Pg. 组，PD 组高于 N 组、DM 组、Pg. 组，PD 组 LPS 高于 N 组、DM 组，见表 7。

表 7 4 组小鼠 OGTT AUC 及血清 LPS 含量比较

表 2 灌胃前小鼠体质量变化情况（g）

Table 2 Changes of body mass in mice before irrigation

分组	只数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
N 组	8	21.05 ± 0.83	21.44 ± 1.05	21.11 ± 1.29	20.36 ± 0.94	22.89 ± 1.85	23.79 ± 1.72
DM 组	8	21.05 ± 0.83	23.55 ± 0.89[a]	25.85 ± 2.14[a]	28.74 ± 2.02[a]	27.48 ± 1.22[a]	25.69 ± 1.35[a]
Pg. 组	8	21.00 ± 0.64	21.50 ± 0.85[b]	20.10 ± 0.55[b]	22.08 ± 1.59[b]	22.50 ± 2.52[b]	23.88 ± 1.86[b]
PD 组	8	20.88 ± 0.72	23.03 ± 1.53[a]	25.38 ± 1.05[ac]	29.26 ± 2.40[ac]	28.04 ± 1.92[ac]	25.45 ± 0.94[ac]
F 值		0.012	7.403	35.835	50.012	18.471	3.563
P 值		0.998	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.027

注：N 组 = 空白对照组，DM 组 = 模型组，Pg. 组 = 牙龈卟啉单胞菌组，PD 组 = 模型 + 牙龈卟啉单胞菌组；[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg. 组比较 $P<0.05$。

表 3 灌胃后小鼠体质量变化情况（g）

Table 3 Changes of body mass in mice after irrigation

分组	只数	第 7 周	第 8 周	第 9 周	第 10 周	第 11 周
N 组	8	25.55 ± 1.14	25.91 ± 0.98	26.26 ± 0.88	26.08 ± 0.78	26.08 ± 0.83
DM 组	8	25.84 ± 1.66	24.39 ± 1.98	23.46 ± 2.25[a]	22.20 ± 1.51[a]	20.91 ± 1.64[a]
Pg. 组	8	25.39 ± 0.98	26.15 ± 0.74	26.06 ± 0.79[b]	25.23 ± 1.37[b]	24.33 ± 0.91[b]
PD 组	8	25.60 ± 1.56	24.75 ± 1.04	22.16 ± 1.59[ac]	20.68 ± 1.22[ac]	18.96 ± 1.44[abc]
F 值	$F_{交互}=32.544$，$F_{组间}=23.272$，$F_{时间}=42.092$					
P 值	$P_{交互}<0.01$，$P_{组间}<0.01$，$P_{时间}<0.01$					

注：[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg. 组比较 $P<0.05$。

表 4 灌胃前小鼠 FPG 变化（mmol/L）
Table 4 Changes of fasting blood glucose in mice before irrigation

分组	只数	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
N 组	8	5.91 ± 0.46	6.09 ± 0.38	6.41 ± 0.56	6.09 ± 0.68	6.26 ± 0.53	5.83 ± 0.66
DM 组	8	6.08 ± 0.68	6.43 ± 0.47	6.64 ± 0.47	7.51 ± 0.18[a]	13.34 ± 1.20[a]	14.26 ± 1.12[a]
Pg. 组	8	6.06 ± 0.66	6.06 ± 0.40	6.46 ± 0.60	5.86 ± 0.60[b]	6.28 ± 0.48[b]	5.96 ± 0.78[b]
PD 组	8	5.96 ± 0.95	6.28 ± 0.66	7.13 ± 0.31[ac]	7.19 ± 0.84[ac]	13.75 ± 1.14[ac]	14.19 ± 1.59[ac]
F 值		0.098	0.972	3.390	13.480	173.660	153.534
P 值		0.960	0.420	0.032	<0.01	<0.01	<0.01

注：[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg. 组比较 $P<0.05$。

表 5 灌胃后小鼠 FPG 变化（mmol/L）
Table 5 Changes of fasting blood glucose in mice after irrigation

分组	只数	第 7 周	第 8 周	第 9 周	第 10 周	第 11 周
N 组	8	5.61 ± 0.64	5.98 ± 0.69	6.15 ± 0.46	6.46 ± 0.58	6.08 ± 0.63
DM 组	8	13.91 ± 2.56[a]	14.30 ± 1.71[a]	14.46 ± 2.04[a]	13.84 ± 1.62[a]	14.26 ± 1.32[a]
Pg. 组	8	6.45 ± 0.46[b]	6.58 ± 0.58[b]	6.95 ± 0.53[b]	7.45 ± 1.23[b]	8.15 ± 1.90[b]
PD 组	8	13.73 ± 1.04[ac]	14.05 ± 0.57[ac]	14.23 ± 1.30[ac]	15.84 ± 1.77[abc]	17.14 ± 2.20[abc]
F 值		$F_{交互}$=2.187，$F_{组间}$=358.936，$F_{时间}$=6.371				
P 值		$P_{交互}$=0.021，$P_{组间}$<0.01，$P_{时间}$<0.01				

注：[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg. 组比较 $P<0.05$。

表 6 4 组小鼠 OGTT 各时间点血糖比较（mmol/L）
Table 6 Comparison of blood glucose at each time point of OGTT test in 4 groups of mice

分组	只数	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
N 组	8	6.01 ± 0.68	12.31 ± 2.01	10.63 ± 1.73	7.70 ± 0.74	6.16 ± 0.55
DM 组	8	12.43 ± 1.55[a]	20.00 ± 4.89[a]	18.35 ± 4.30[a]	15.54 ± 2.26[a]	13.95 ± 1.32[a]
Pg. 组	8	7.56 ± 0.93[b]	15.09 ± 1.55[b]	13.46 ± 1.42[b]	10.59 ± 1.60[b]	9.30 ± 1.55[ab]
PD 组	8	15.08 ± 1.29[abc]	25.79 ± 3.43[abc]	24.01 ± 4.39[abc]	20.88 ± 4.74[abc]	16.91 ± 1.89[abc]
F 值		$F_{交互}$=3.902，$F_{组间}$=52.580，$F_{时间}$=63.235				
P 值		$P_{交互}$=0.013，$P_{组间}$<0.01，$P_{时间}$<0.01				

注：OGTT= 口服葡萄糖耐量试验；[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg. 组比较 $P<0.05$。

Table 7 Comparison of AUC of OGTT and serum LPS level among four groups of mice

分组	只数	OGTT AUC（mM/min）	LPS（EU/mL）
N 组	8	1 102 ± 96	1.55（1.46，3.17）
DM 组	8	2 012 ± 302[a]	3.52（2.95，4.50）
Pg. 组	8	1 427 ± 137[b]	3.92（3.02，5.49）
PD 组	8	2 597 ± 394[abc]	9.42（5.63，14.10）[ab]
F 值		25.348	20.418
P 值		<0.01	<0.01

注：[a] 表示与 N 组比较 $P<0.05$，[b] 表示与 DM 组比较 $P<0.05$，[c] 表示与 Pg 组比较 $P<0.05$。

2.3 4 组小鼠结肠紧密连接蛋白及炎症因子 mRNA 表达水平

4 组小鼠 ZO-1、Occludin、IL-17A、IL-10、TNF-α、TLR4 比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），其中 PD 组 ZO-1 低于 N 组，DM 组 Occludin 低于 N 组，PD 组 Occludin 低于 N 组、DM 组、Pg. 组，PD 组 IL-17A 低于 N 组、Pg. 组，N 组 IL-10 高于 DM 组、Pg. 组、PD 组，PD 组 TNF-α 高于 N 组、DM 组、Pg. 组，Pg. 组、PD 组 TLR4 高于 N 组，见表 8。

2.4 FPG 与结肠紧密连接蛋白 mRNA 和血清 LPS 含量的相关性分析

相关性分析结果表明，FPG 与 LPS 呈正相关，与 Occludin 呈负相关（$P<0.05$），见表 9。

2.5 4 组小鼠结肠组织 HE 染色结果

结肠 HE 染色切片显示，N 组结肠隐窝深度及形态结构正常，肠腺数量丰富，未见明显炎性细胞。Pg. 组和 DM 组固有层可见结缔组织增生，伴淋巴细胞灶性浸润，局部间质也可见少量淋巴细胞浸润；而 PD 组固有层伴淋巴细胞灶性浸润；局部间质可见少量淋巴细胞浸润；黏膜下层轻度水肿，结缔组织排列稀疏，伴少量淋巴细胞浸润，结肠隐窝深度变浅，部分隐窝形态不典型，见图 1。

表 8 4 组小鼠结肠紧密连接蛋白及炎症因子 mRNA 表达水平比较

Table 8 Comparison of mRNA expression levels of colonic tight junction protein and inflammatory factors among 4 groups of mice

分组	只数	ZO-1	Occludin	IL-17A	IL-10	TNF-α	TLR4
N 组	8	1.05（0.70，1.16）	1.02 ± 0.24	1.03（0.40，1.76）	1.04 ± 0.30	1.07 ± 0.39	1.06 ± 0.36
DM 组	8	0.95（0.40，1.17）	0.60 ± 0.14[a]	0.34（0.15，1.54）	0.55 ± 0.09[a]	1.11 ± 0.38	1.67 ± 0.49
Pg. 组	8	0.52（0.30，1.23）	0.74 ± 0.28	0.94（0.53，1.38）	0.58 ± 0.19[a]	1.14 ± 0.76	2.46 ± 1.09[a]
PD 组	8	0.36（0.26，0.46）[a]	0.20 ± 0.05[abc]	0.16（0.12，0.34）[ac]	0.60 ± 0.13[a]	2.97 ± 1.10[abc]	3.94 ± 1.95[a]
F（H）值		9.940[d]	23.867	9.571[d]	11.010	13.459	9.249
P 值		0.019	<0.01	0.023	<0.01	＜ 0.01	<0.01

注：[a] 表示与 N 组比较 P<0.05，[b] 表示与 DM 组比较 P<0.05，[c] 表示与 Pg 组比较 P<0.05，[d] 为 H 值。

表 9 小鼠 FPG 与结肠紧密连接蛋白 mRNA 和血清 LPS 含量的相关性分析

Table 9 Correlation analysis of fasting blood glucose，colonic tight junction protein mRNA expression and serum LPS levels in mice

项目	r（r_s）	P 值
LPS	0.635[a]	<0.01
ZO-1	-0.377[a]	0.034
Occludin	-0.746	<0.01

注：[a] 表示 r_s 值。

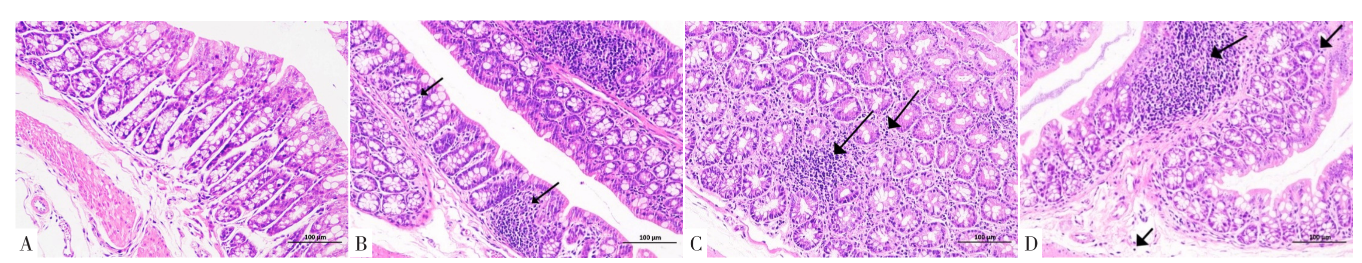
3 讨论

每人每天可以分泌 1.0~1.5 L 的唾液。在生理条件下，由于受到胃酸和碱性胆汁的保护，唾液菌群很少到达肠道。然而，牙周炎患者的唾液菌群与口腔健康者明显不同[11，12]。牙周病患者的唾液中 Pg. 等有害菌丰度明显更高[13]。21~23 岁重度牙周炎患者每天大约吞咽 1012~1013 个 Pg.[14]。Pg. 由于其抗酸性可能会通过胃酸到达肠道，破坏肠道内环境的平衡[10]。

在肠道内，肠道屏障由微生物屏障、黏液屏障、物理屏障和免疫屏障组成，构成了肠道抵御外部病原体的第一道防线，无论是哪一层肠道屏障的破坏，均可能会导致“肠瘘”的形成，肠道内细菌及代谢产物则可能通过肠道进入血液，加重多种系统的疾病，如关节炎、肝病、脑病、T2DM、炎症性肠病（IBD）、肥胖等[7，15-17]。本研究发现，Pg. 灌胃后，肠道免疫屏障及机械屏障功能受损，T2DM 小鼠的血糖调节能力和胰岛素敏感性降低，在高血糖的基础上，糖代谢紊乱进一步加重。

肠道免疫屏障主要由免疫细胞及其细胞因子组成，肠道免疫调节细胞作为肠道菌群与糖尿病之间的“桥梁”，免疫平衡的破坏伴随 T 淋巴细胞及细胞因子平衡紊乱，通过影响胰腺、肝脏等其他内分泌器官，对机体免疫状态、糖脂代谢和胰岛素敏感性产生不利影响[18]。CD4+T 辅助细胞（Th）在维持肠道免疫中起着关键作用，CD4+IL-17+Th17 细胞和 CD4+CD25+Foxp3+T 细胞（Th17/Treg 细胞）之间的平衡是免疫稳态的基础。肠道免疫失衡时常表现为 Th17/Treg 细胞及相关细胞因子比例失衡，表现为 Th17 相关促炎因子 IL-6、TNF-α、IL-17A 和 IL-17F 浓度增加，而 Treg 相关抗炎因子转化生长因子-β（TGF-β）、IL-10 则相应减少。本研究发现，灌胃 Pg. 后，T2DM 小鼠结肠内促炎因子 TNF-α 的表达增加，而抗炎因子 IL-10 的基因表达进一步减少，HE 染色结果显示，PD 组结肠固有层及间质内炎症性病理变化较 DM 组和 Pg. 组更为明显，表明结肠内可能存在 Th17/Treg 比例失调，肠道免疫稳态破坏更加显著。其中 IL-10 不仅在免疫反应中起抗炎作用，近年来多项研究发现，其在糖尿病发展中也发挥一定保护作用。袁等[19]发现，T2DM 患者外周血中 Th17/Treg 细胞百分率及相关细胞因子（主要是 IL-10 和 TGF-β）水平显著降低。STZ 诱导的非肥胖型糖尿病小鼠在接受携带有编码 IL-4 和 IL-10 质粒的细菌株联合治疗后，可以有效降低高血糖以及胰岛的破坏[20]。推测灌胃 Pg. 后 IL-10 的减少可能不仅通过影响肠道免疫影响血糖，还有可能是 IL-10 本身对血糖的直接影响。

肠道 Th17/Treg 存在免疫失衡时通常伴有 IL-17A 的增加。在胶原蛋白诱导的关节炎模型中，口服 Pg. 可



注：A 为 N 组，B 为 Pg. 组，C 为 DM 组，D 为 PD 组；箭头为淋巴细胞浸润。

图 1 小鼠结肠组织 HE 染色（×200）

Figure 1 HE staining of colon tissue in mice

诱导肠道免疫模式向 Th17 优势方向转变，并伴随肠道微生物区系的改变，加重小鼠胶原蛋白诱导的关节炎症状[21]。但也有研究发现，IL-17A 可在多种组织中具有诱导促炎和抗炎反应两种作用[22]，在肠道中还可以促进上皮细胞增殖，上调抗菌肽和紧密连接蛋白的表达，从而保护肠粘膜免受各种病原体的感染[23]。应用 IL-17A 抑制剂或 IL-17A 受体（IL-17RA）抑制剂可削弱结肠炎小鼠肠道屏障，加重肠道炎症[24]。此外，有研究发现，高脂饮食小鼠其肠道内 Th17/IL-17 的减少与体重增加，糖耐量减少及胰岛素抵抗具有相关性[25]。证明胰岛素敏感性降低在内的代谢性疾病早期与肠道微生物群多样性降低，以及 IL-17/IL-22 下降相关[26]。肠道中除 Th17 细胞外，自然杀伤细胞（NK 细胞）、γδT 细胞、CD8+T 细胞等多种细胞也参与 IL-17 的分泌，本研究中，灌胃 Pg. 后的糖尿病小鼠结肠 IL-17A 呈现减少趋势，并与紧密连接蛋白变化相一致。提示 Pg. 可能通过影响其他免疫细胞分泌 IL-17 进而对结肠紧密连接蛋白产生影响，而其具体机制有待进一步探索。

Toll 样受体（TLRs）是病原体相关分子模式（PAMP）识别受体，不仅表达在天然免疫细胞和特化抗原提呈细胞（APC）表面，也表达在 CD4+T 细胞表面。其中 TLR4 可以识别并结合革兰氏细菌的 LPS，激活核因子-κB 信号通路，引起肠道 Th17/Treg 细胞比例失调和胰岛素抵抗[27，28]，进而影响糖尿病的发展。

Occludin、ZO-1 是构成肠道紧密连接的主要蛋白因子[29]，常作为肠道机械屏障功能的检测指标。本研究发现，与 N 组小鼠对比，DM 组和 PD 组结肠 Occludin 的 mRNA 表达量均降低，而 PD 组的两种紧密连接蛋白的降低更为明显。表明无论是糖尿病还是单纯灌胃 Pg. 均可能对肠道机械屏障和免疫屏障产生一定影响。而在 T2DM 基础上进行 Pg. 灌胃后，肠道机械屏障和免疫平衡的破坏更为明显，并且血清内 LPS 含量显著增加；小鼠血糖变化与 Occludin、ZO-1 的 mRNA 表达呈负相关，与 LPS 含量变化呈正相关，进一步证明，肠道屏障破坏导致的 LPS 入血可能是引起血糖变化的关键因素。

综上所述，Pg. 灌胃处理后，对结肠机械屏障及免疫屏障的破坏，在高血糖背景下更为显著，可能导致肠道内 LPS 入血，进一步加重糖尿病小鼠血糖调节及胰岛素敏感性受损。体外研究发现，LPS 可以通过 X 盒结合蛋白 1 调控脂肪细胞胰岛素受体底物 1、磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1、蛋白激酶 B 信号通路，影响胰岛素信号的传导[30]，因此，LPS 可能是 Pg. 通过肠道引起远端器官糖脂代谢损害的重要靶点。对于 Pg. 对肠道屏障的破坏，推测一方面可能是由于灌胃 Pg. 后引起肠道微生物及代谢物变化的直接作用[31]；另一方面可能与肠道免疫平衡打破，如 IL-17A、IL-10 减少，TLR4、TNF-α 等免疫因子增加有关。本研究进一步验证了 Pg. 可以通过口-肠途径影响糖尿病的发展，而其引起肠道免疫屏障、机械屏障破坏的潜在机制，以及 LPS 入血后对全身糖脂代谢的具体机制有待进一步的探索。

作者贡献：李萧纹提出主要研究目标，负责研究的构思与设计，研究的实施，撰写论文；陈文文、黄明坤进行数据收集与整理，统计学处理，图、表的绘制与展示；闫福华、莫朝伦进行论文的修订；张军梅，李萧纹负责最终版本修订，对论文负责。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 闫福华. 牙周炎对全身疾病和健康影响的研究进展[J]. 口腔医学，2018，38（7）：577-581. DOI：10.13591/j.cnki.kqyx.2018.07.001.

[2] LING C，BACOS K，RÖNN T. Epigenetics of type 2 diabetes mellitus and weight change - a tool for precision medicine?[J]. Nat Rev Endocrinol，2022，18（7）：433-448. DOI：10.1038/s41574-022-00671-w.

[3] STÖHR J，BARBARESKO J，NEUENSCHWANDER M，et al. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus：a systematic review and meta-analysis of cohort studies[J]. Sci Rep，2021，11（1）：13686. DOI：10.1038/s41598-021-93062-6.

[4] MIRNIC J，DJURIC M，GUSIC I，et al. Effects of nonsurgical periodontal therapy on salivary 8-hydroxy-deoxyguanosine levels and glycemic control in diabetes mellitus type 2 patients[J]. Biomedicines，2022，10（9）：2269. DOI：10.3390/biomedicines10092269.

[5] KITAMOTO S，NAGAO-KITAMOTO H，JIAO Y Z，et al. The intermucosal connection between the mouth and gut in commensal pathobiont-driven colitis[J]. Cell，2020，182（2）：447-462.e14. DOI：10.1016/j.cell.2020.05.048.

[6] FENG Y K，WU Q L，PENG Y W，et al. Oral P. gingivalis impairs gut permeability and mediates immune responses associated with neurodegeneration in LRRK2 R1441G mice[J]. J Neuroinflammation，2020，17（1）：347. DOI：10.1186/s12974-020-02027-5.

[7] ZHOU N，ZOU F G，CHENG X，et al. Porphyromonas gingivalis induces periodontitis，causes immune imbalance，and promotes rheumatoid arthritis[J]. J Leukoc Biol，2021，110（3）：461-473. DOI：10.1002/JLB.3MA0121-045R.

[8] LIU Y M，HUANG W K，DAI K，et al. Inflammatory response of gut，spleen，and liver in mice induced by orally administered Porphyromonas gingivalis[J]. J Oral Microbiol，2022，14（1）：2088936. DOI：10.1080/20002297.2022.2088936.

[9] DONALDSON G P，LEE S M，MAZMANIAN S K. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. Nat Rev Microbiol，2016，14（1）：20-32. DOI：10.1038/nrmicro3552.

[10] MULHALL H，HUCK O，AMAR S. Porphyromonas gingivalis，a long-range pathogen：systemic impact and therapeutic

implications［J］. Microorganisms，2020，8（6）：869. DOI：10.3390/microorganisms8060869.

［11］BAO J，LI L L，ZHANG Y H，et al. Periodontitis may induce gut microbiota dysbiosis via salivary microbiota［J］. Int J Oral Sci，2022，14（1）：32. DOI：10.1038/s41368-022-00183-3.

［12］SHI C，CAI L T，XUN Z，et al. Metagenomic analysis of the salivary microbiota in patients with caries，periodontitis and comorbid diseases［J］. J Dent Sci，2021，16（4）：1264-1273. DOI：10.1016/j.jds.2020.12.002.

［13］MA J L，KAGEYAMA S，TAKESHITA T，et al. Clinical utility of subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota for detecting periodontitis［J］. PLoS One，2021，16（6）：e0253502. DOI：10.1371/journal.pone.0253502.

［14］HE J Y，HUANG W J，PAN Z W，et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva，supragingival，and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis［J］. Clin Oral Investig，2012，16（6）：1579-1588. DOI：10.1007/s00784-011-0654-4.

［15］NASCIMENTO J C，MATHEUS V A，OLIVEIRA R B，et al. High-fat diet induces disruption of the tight junction-mediated paracellular barrier in the proximal small intestine before the onset of type 2 diabetes and endotoxemia［J］. Dig Dis Sci，2021，66（10）：3359-3374. DOI：10.1007/s10620-020-06664-x.

［16］JIN R，NING X Q，LIU X，et al. Porphyromonas gingivalis-induced periodontitis could contribute to cognitive impairment in Sprague-Dawley rats via the P38 MAPK signaling pathway［J］. Front Cell Neurosci，2023，17：1141339. DOI：10.3389/fncel.2023.1141339.

［17］CHOPYK D M，GRAKOUI A. Contribution of the intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders［J］. Gastroenterology，2020，159（3）：849-863. DOI：10.1053/j.gastro.2020.04.077.

［18］LI Q W，GAO Z Z，WANG H，et al. Intestinal immunomodulatory cells（T lymphocytes）：a bridge between gut microbiota and diabetes［J］. Mediators Inflamm，2018，2018：9830939. DOI：10.1155/2018/9830939.

［19］YUAN N，ZHANG H F，WEI Q，et al. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells，interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients［J］. and，2018，126（2）：96-101. DOI：10.1055/s-0043-113454.

［20］PREISSER T M，DA CUNHA V P，SANTANA M P，et al. Recombinant Lactococcus lactis carrying IL-4 and IL-10 coding vectors protects against type 1 diabetes in NOD mice and attenuates insulitis in the STZ-induced model［J］. J Diabetes Res，2021，2021：6697319. DOI：10.1155/2021/6697319.

［21］SATO K，TAKAHASHI N，KATO T，et al. Aggravation of collagen-induced arthritis by orally administered Porphyromonas gingivalis through modulation of the gut microbiota and gut immune system［J］. Sci Rep，2017，7（1）：6955. DOI：10.1038/s41598-017-07196-7.

［22］FENG Y，CHEN Z，TU S Q，et al. Role of interleukin-17A in the pathomechanisms of periodontitis and related systemic chronic inflammatory diseases［J］. Front Immunol，2022，13：862415. DOI：10.3389/fimmu.2022.862415.

［23］CHEN L，RUAN G C，CHENG Y，et al. The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress［J］. Front Immunol，2022，13：1055914. DOI：10.3389/fimmu.2022.1055914.

［24］DENG Z Z，WANG S F，WU C F，et al. IL-17 inhibitor-associated inflammatory bowel disease：a study based on literature and database analysis［J］. Front Pharmacol，2023，14：1124628. DOI：10.3389/fphar.2023.1124628.

［25］HONG C P，PARK A，YANG B G，et al. Gut-specific delivery of T-helper 17 cells reduces obesity and insulin resistance in mice［J］. Gastroenterology，2017，152（8）：1998-2010. DOI：10.1053/j.gastro.2017.02.016.

［26］ZHOU X，JOHNSON J S，SPAKOWICZ D，et al. Longitudinal analysis of serum cytokine levels and gut microbial abundance links IL-17/IL-22 with Clostridia and insulin sensitivity in humans［J］. Diabetes，2020，69（8）：1833-1842. DOI：10.2337/db19-0592.

［27］GEORGE L，RAMASAMY T，SIRAJUDEEN K，et al. LPS-induced apoptosis is partially mediated by hydrogen sulphide in RAW 264.7 murine macrophages［J］. Immunol Invest，2019，48（5）：451-465. DOI：10.1080/08820139.2019.1566355.

［28］JIA L，WU R Q，HAN N N，et al. Porphyromonas gingivalis and Lactobacillus rhamnosus GG regulate the Th17/Treg balance in colitis via TLR4 and TLR2［J］. Clin Transl Immunology，2020，9（11）：e1213. DOI：10.1002/cti2.1213.

［29］KUO W T，ODENWALD M A，TURNER J R，et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival［J］. Ann N Y Acad Sci，2022，1514（1）：21-33. DOI：10.1111/nyas.14798.

［30］陆佳艺，伍倩琪，陈伊燕，等. 牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖通过 X 盒结合蛋白 1 调控脂肪细胞胰岛素信号通路的机制研究［J］. 华西口腔医学杂志，2022，40（2）：148-154. DOI：10.7518/hxkq.2022.02.004.

［31］READ E，CURTIS M A，NEVES J F. The role of oral bacteria in inflammatory bowel disease［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18（10）：731-742. DOI：10.1038/s41575-021-00488-4.

（收稿日期：2023-04-28；修回日期：2023-08-14）

（本文编辑：邹琳）